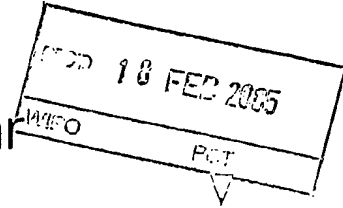




KONGERIKET NORGE
The Kingdom of Norway

Bekreftelse på patentsøknad nr
Certification of patent application no



20040128

➤ Det bekreftes herved at vedheftede dokument er nøyaktig utskrift/kopi av ovennevnte søknad, som opprinnelig inngitt 2004.01.12

➤ It is hereby certified that the annexed document is a true copy of the above-mentioned application, as originally filed on 2004.01.12

2005.02.05

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Line Reum

Line Reum
Saksbehandler



Søknad om patent

www.patentstyret.no



Ferdig utfylt skjema sendes til adressen nedenfor. Vennligst ikke heft sammen sidene.
Vi ber om at blankettene utfylles *maskinelt* eller ved bruk av *blokkbokstaver*. Skjema for
utfylling på datamaskin kan lastes ned fra **www.patentstyret.no**.

SØKNAD s. 1 av 2

FLERE SØKERE

FLERE OPPFINNERE

PRIORITETER

VEILEDNING

Søker Den som søker om patent blir også innehaver av en eventuell rettighet. Må fylles ut!

Foretakets navn (fornavn hvis søker er person):

Geir

Etternavn (hvis søker er person):

Hetland

☐ Kryss av hvis søker tidligere har vært kunde hos Patentstyret.

Oppgi gjerne kundennummer:

Adresse:

Nadderudveien 138A

Postnummer:

13539

Poststed:

Eiksmarka

Land:

Norge

☐ Kryss av hvis flere søkere er angitt i medfølgende skjema eller på eget ark.

☒ Kryss av hvis søker(ne) utfører mindre enn 20 årsverk (se veiledning).

☐ Kryss av hvis det er vedlagt erklæring om at patentsøker(ne) innehar retten til oppfinnelsen.

Kontaktinfo Hvem skal Patentstyret henvende seg til? Oppgi telefonnummer og eventuell referanse.

Fornavn til kontaktperson for fullmektig eller søker:

Trond

Etternavn:

Gustad



Telefon:

2 1 0 0 9 0 0 0

Referanse (maks. 30 tegn):

156449 TG/ks

Evt. adresse til kontaktperson:

c/o Oslo Patentkontor AS

Postboks 7007 M

Postnummer:

0306

Poststed:

OSLO

Land:

Fullmektig Hvis du ikke har oppnevnt en fullmektig, kan du gå til neste punkt.

Foretakets navn (fornavn hvis fullmektig er person):

Oslo Patentkontor AS

Etternavn (hvis fullmektig er person):

☒ Kryss av hvis fullmektig tidligere har vært kunde hos Patentstyret.

Oppgi gjerne kundennummer: 3 0 0 8 2

Adresse:

Postboks 7007 M

Postnummer:

0306

Poststed:

OSLO

Land:

Oppfinner Oppfinneren skal alltid oppgis, selv om oppfinner og søker er samme person.

Oppfinnerens fornavn:

Geir

Etternavn:

Hetland

☐ Kryss av hvis oppfinner tidligere har vært kunde hos Patentstyret.

Oppgi gjerne kundennummer:

Adresse:

se søker

Postnummer:

Poststed:

Land:

☐ Kryss av hvis flere oppfinnere er angitt i medfølgende skjema eller på eget ark.

ADRESSE

► Postboks 8160 Dep.
Københavnsgaten 10
0033 Oslo

TELEFON

► 22 38 73 00

TELEFAKS

► 22 38 73 01

BANKGIRO

► 8276.01.00192

ORGANISASJONSNR.

► 971526157 MVA



PATENTSTYRET®
Styret for det industrielle rettsvern



Tittel Gi en kort benevnelse eller tittel for oppfinnelsen (ikke over 256 tegn, inkludert mellomrom).

Tittel:

Anvendelse av soppen *Agaricus blazei* Murill ved fremstilling av medikamentelle sammensetninger

PCT Fylles bare ut hvis denne søknaden er en videreføring av en tidligere innlevert internasjonal søknad (PCT).

Inngivelsesdato (åååå.mm.dd):

Søknadsnummer:

PCT-søknadens dato og nummer:

PCT

/

Prioritetskrav Hvis du ikke har søkt om denne oppfinnelsen tidligere (i et annet land eller i Norge) kan du gå videre til neste punkt.

Prioritet kreves på grunnlag av tidligere innlevert søknad i Norge eller utlandet:

Inngivelsesdato (åååå.mm.dd):

Landkode:

Søknadsnummer:

Opplysninger om tidligere søknad. Ved flere krav skal tidligste prioritet angis her:

☐ Flere prioritetskrav er angitt i medfølgende skjema, eller på eget ark.

Mikroorganisme Fylles bare ut hvis oppfinnelsen omfatter en mikroorganisme.

Søknaden omfatter en kultur av mikroorganisme. Deponeringssted og nummer må oppgis:

Deponeringssted og nummer (betyr gjerne eget ark).

☐ Prøve av kulturen skal bare utleveres til en særlig sakkyndig.

Avdelt/utskilt Hvis du ikke har søkt om patent i Norge tidligere, kan du gå videre til neste punkt.

Søknaden er avdelt eller utskilt fra tidligere levert søknad i Norge:

☐ Avdelt søknad

Dato (åååå.mm.dd):

Søknadsnummer:

☐ Utskilt søknad

Informasjon om opprinnelig søknad/innsendt tilleggs materiale

Annet

☐ Søknaden er også levert per telefaks.

Oppgi dato (åååå.mm.dd):

☐ Jeg har bedt om forundersøkelse.

Oppgi nr (årstall - nummer - bokstav):

Vedlegg Angi hvilken dokumentasjon av oppfinnelsen du legger ved, samt andre vedlegg.

☒ Eventuelle tegninger i to eksemplarer

Oppgi antall tegninger:

4

☒ Beskrivelse av oppfinnelsen i to eksemplarer☒ Patentkrav i to eksemplarer☐ Fullmaktsdokument(er)☐ Sammendrag på norsk i to eksemplarer☐ Overdragelsesdokument(er)☐ Dokumentasjon av eventuelle prioritetskrav (prioritetsbevis)☐ Erklæring om retten til oppfinnelsen☐ Oversettelse av internasjonal søknad i to eksemplarer (kun hvis PCT-felt over er fylt ut)

Dato/underskrift Sjekk at du har fylt ut punktene under «Søker», «Oppfinner» og «Vedlegg». Signer søknaden.

Sted og dato (blokkbokstaver):

Oslo, 12. januar 2004

Navn i blokkbokstaver:

Oslo Patentkontor AS

NB! Søknadsavgiften vil bli fakturert for alle søknader (dvs. at søknadsavgiften ikke skal følge søknaden). Betalingsfrist er ca. 1 måned, se faktura.

Signatur:

OSLO PATENTKONTOR AS
POSTBOKS 7007 H, N-0306 OSLO**PATENTSTYRET®**
Styret for det industrielle rettsvern

12. januar 2004

TG/-/ks

O: 156449

Søker:

Geir Hetland

Nadderudveien 138A

1353 Eiksmarka

Norge

Oppfinnere:

Geir Hetland

Nadderudveien 138A

1353 Eiksmarka

Norge

Tittel:

Anvendelse av soppen *Agaricus blazei* Murill ved
fremstilling av medikamentelle sammensetninger

Foreliggende oppfinnelse vedører Anvendelse av soppen *Agaricus blazei murill* (AbM) ved fremstilling av et medikament til bekjempelse eller forebygning av bakterielle infeksjoner i pattedyr, og spesielt hvor den bakterielle infeksjon er forårsaket av pneumokokker og enda mer spesielt hvor pattedyret er et menneske.

5 Innledning

Bruk av medisinske sopper har vært en del av tradisjonell asiatisk kultur i mer enn 3000 år.

Mange substanser fra sopper er vist å påvirke immunsystemet og kunne brukes til behandling av en rekke sykdommer (Wasser et al. 1999). I Japan er det gjort mye forskning på helseeffekter av sopper (Ikekawa 2001). *Agaricus blazei Murill* (AbM) fra familien *Basidiomycetes* er en slik medisinsk sopp som er meget populær i Japan og dyrkes kunstig (Chen 2000) for helsekostmarkedet. Denne soppen vokser naturlig nær en liten brasiliansk landsby, Pietade, utenfor São Paulo hvor det daglig er store klimatiske endringer. I dette området ble AbM brukt i maten og lokalbefolkningen syntes å ha lav forekomst av kreft og andre helseproblemer (Huang 1997). I 1965 sendte dr. Takatoshi Furumoto AbM-sporer til Japan og forskere ved The National Cancer Center Research Institute of Japan og støttet av The Japanese Pharmacological Society publiserte etter hvert resultater som viste at AbM hadde kreftbekjempende egenskaper. AbM er rik på immunstimulerende og kreftmotvirkende sukkermolekyler (polysakkarider) som beta (1,3) og (1,6) glukaner (Kawagishi et al. 1989; Iwade & Mizuno, 1997; Huang 1997; Stamets 2000, Ohno et al. 2001; Sorimachu et al. 2001).

Ekstrakter av den spiselige soppen *Agaricus blazei Murill* (AbM) har blitt brukt de siste 10-20 år i Japan som helsekost mot en rekke sykdommer som kreft, sukkersyke, åreforkalking og kronisk leverbetennelse.

Alle disse sykdommer er imidlertid grunnet svekkelse/abnormaliteter i celler hos den angrepne person, og har ikke sitt opphav i angrep fra ytre organismer så som bakterier.

Den kreft-hemmende effekten av AbM-komponenter er vitenskapelig dokumentert i musmodeller og på kreftceller (Itoh et al., 1994; Fujimiya et al. 1998; Ebina & Fijimiya, 1998; Takaku et al. 2001; Menoli et al. 2001; Bellini et al. 2003). AbM mycelium er også påvist å hemme ødeleggende effekter (cytopatiske) av WEE (western equine encephalitis) virus på celler i kultur (Sorimachi et al. 2001). NB - denne artikkelen undersøkte ikke evt. effekt av AbM mycelium på virusinfeksjonen som sådan. Ellers er

det ikke tilgjengelig engelsk-språklige rapporter i offentlige databaser som dokumenterer andre helseeffekter av AbM, heller ikke ovenfor infeksjoner.

Matsoppen *Agaricus blazei* Murill (AbM), som vokser naturlig utenfor São Paulo, Brazil, har de siste 10-årene blitt dyrket kunstig og brukt i helsekost i Japan for å beskytte mot en rekke av de ovenfor nevnte sykdommer, inkludert kreft. Selv om slik anvendelse av denne soppen er kjent, er det ingen selvfølge at soppen også skal virke mot bakterielle infeksjoner. Mange helsekostprodukter er regnet for å kunne virke kurerende og forebyggende på sykdommer uten at dette har blitt dokumentert. Videre er det ikke umiddelbart innlysende at selv om et produkt er kjent for å forsterke immunsystemet, vil det samme produktet være virksomt mot bakterielle infeksjoner. Heller ikke er det åpenbart at effekten av β -glukaner generelt ville tilsi at ekstrakter fra soppen *Agaricus blazei* Murill skulle være virksomt mot bakterielle infeksjoner, og heller ikke at AbM faktisk er mer virksomt enn øvrige naturlige medikamenter på dette område.

Effekten av ekstrakter av AbM mot bakteriell infeksjon i mus er i henhold til foreliggende opprinnelse undersøkt i en modell hvor musene utsettes for dødelig infeksjon med pneumokokker (*Streptococcus pneumonia* serotype 6B). AbM-ekstrakt ble gitt via mavesonde til musene fra 24 timer til umiddelbart før innsprøyting av pneumokokker i bukhulen. Det ble tatt blodprøver daglig til bakteriedyrkning fra en lårvene på musene og overlevelsesraten av musene ble notert. Det ble funnet at en dose AbM-ekstrakt gitt med mavesonde, enten 24, 2 eller 0 timer før bakteriesmitte, reduserte bakterietallet i blod og øket overlevelsen av dyrene i forhold til dyr som fikk saltvann via mavesonde. Hele 50% av dyrene som fikk et AbM ekstrakt 24 timer før smitte overlevde dag 10 mot 13% av kontrolldyrene dag 7. Dette viser at ekstrakt fra AbM kan brukes som beskyttelse mot og evt. behandling av pneumokokkinfeksjon.

I en tid med økende antibiotikaresistens vil AbM kunne være et naturlig alternativ eller supplement til antibiotika og evt. andre anti-infeksjonsmidler, men med færre bivirkninger og positiv bieffekt som kreftbeskyttende substans.

Pneumokokken, *Streptococcus pneumoniae*, er en gram-positiv diplokokk som forårsaker potensielt dødelige sykdommer som blodforgiftning (sepsis) og hjernehinnebetennelse, men også mindre alvorlige infeksjoner som lunge-, mellomøre- og bihulebetennelse. Det finnes 90 undergrupper (serotyper) av pneumokokker, deriblant serotype 6B (Henrichsen 1979) som har moderat infeksjonsfremkallende evne (virulens) og derfor gir et forholdsvis langstrakt, men likevel dødelig, sykdomsforløp i

forsøksmus (Aaberge et al. 1995). Siden hyppigheten av antibiotikaresistente bakterier, slik som multiresistent *S. pneumoniae*, er en fare for folkehelsen og antibiotika om få 10-år trolig har ytterligere redusert eller manglende effekt, burde man forsøke å finne gode alternative forbyggende og behandlende prinsipper.

5 β -glukaner er kjente immunmodulerende substanser (Riggi & DiLuzio, 1961; Bøgwald et al., 1984) og hovedkomponenter i celleveggen i mugg og gjærsopp. β -glukaner har anti-infeksjon (Reynolds et al., 1980; Franek et al., 1992) og anti-kreft (Tagucho et al., 1983; Ohno et al., 1987) effekter i dyremodeller. Et 1,3- β -glukan i fruktlegemet i AbM kan være soppens anti-kreft prinsipp) (Ohno et al. 2001).

10 Det er tidligere funnet at β -glukaner (bla. SSG fra soppen *Sclerotinia sclerotiorum* og fra gjærsopp), samt et sukkermolekyl fra grobland, *Plantago major* L., beskytter mot infeksjon med BCG og pneumokokker i musmodeller (Hetland et al., 1998; Hetland et al. 2000a,b, Hetland 2003). Disse effektene ble observert etter injeksjon av substansene i musenes bukhule, men ikke bekreftet etter sondeforing. Forsøk viste at den
15 beskyttende effekten skyldtes stimulering av det medfødte immunsystemet hvor makrofagen er en sentral immuncelle. Det er også vist at SSG og MacroGard® fra gjærsopp hemmer oppvekst av tuberkelbakterien, *Mycobacterium tuberculosis* i makrofagcellekulturer (Hetland & Sandven, 2002).

Målet med foreliggende oppfinnelse er å etablere at matsopp generelt, og *Agaricus blazei*
20 *Murill* spesielt, er anvendelig til behandling av infeksjoner generelt, og bakterielle infeksjoner spesielt, i pattedyr, særslit mennesker.

AbM-ekstrakt beskytter mus mot dødelig pneumokokkinfeksjon med serotypen 6B. Dette ble gjort ved å tilføre pneumokokkene ved hjelp av mavesonde til musene. Effekt av AbM-ekstrakt ble vurdert ut fra bakterietall i veneblod og overlevelsesrate av dyrene.

Material og metode

Mus. Alle dyreeksperiment ble godkjent av den lokale representant for den nasjonale etiske komité for forsøk med dyr og utført i henhold til nasjonal standard fra Landbruksdepartementet. Det ble brukt innavlede mikrobefrie hunnmus av stammen NIH/OlaHsd
5 fra Harlan Olac Ltd., England. Musene var 6 uker gamle ved ankomst og hvilte 1 uke før eksperimentering.

Reagenser

Ekstrakter A, B, C, D og E fra AbM mycelium var fra forskjellige japanske produsenter av helsekost. Ekstrakt A ("gold label type") var det høyest rensede produktet og ekstrakt
10 B ("Katsu type") et mindre rensert produkt, begge fra ACE Co., Ltd., Gifu-ken, Japan. Produsentene av AbM-ekstrakt C, D, og E er ikke informert om denne studien og navnene derfor ikke oppgitt. Fosfatbufret saltvann (PBS) ble brukt som kontroll.

Bakterier. En stamme av *Streptococcus pneumoniae* serotype 6B fra RIVM, Netherland, ble brukt. Den ble holdt frosset og benyttet til smittforsøk som kjent
15 tidligere (Aaberge et al. 1995).

Blodprøvetaking. Det ble tatt blodprøver fra den utvendige lårvenen på bakbena (*Saphena magna*) til musene. Blodet ble så dyrket som kjent tidligere (Aaberge et al. 1995).

Kvantifisering av koloni-formende enheter (CFU) i blod. Venøst blood (25 µl) ble
20 fortynnet 10-folds i Todd-Hewitt agar, og 25 µl av fortynnet blod ble sådd ut på blodagar-plater, som ble inkubert ved 37°C i 5% CO₂. Etter 18 timer ble koloniene telt.

Eksperimentell prosedyre. To eksperimenter ble utført med 7-9 dyr i hver behandlingsgruppe (Tabell 1, Figurlegende). Volumet av PBS eller AbM ekstrakt til sondeforing var 200 µl. Alle dyr ble blødd på tidspunkter angitt i figurene og blodet ble
25 sådd ut på agarplater. Dyrene ble inispisert daglig og svært syke mus ble avlivet ved nakkestrekk.

Målinger. Dette var bakterieinnhold i perifert blod bestemt vha. *S. pneumoniae* CFU telling, og dyrenes overlevelseshastighet.

Statistikk. Parametriske tester ble brukt på normalfordelte data, ellers non-parametriske tester. En-veis repeterte målingers ANOVA/ Tukey's test ble brukt for multiple sammenlikninger, og parret t-test for enkle sammenlikninger. P verdier under 0.05 ble ansett å være statistisk signifikante.

5 Resultat

Effekt av AbM ekstrakt gitt 2 timer før smitte, på S. pneumoniae serotype 6B infeksjon

Mus ble gitt PBS eller et av 5 AbM-ekstrakt (A-E) fra forskjellige produsenter via mavesonde 2 t før bukhule-injeksjon (i.p.) av *S. pneumoniae* serotype 6B. Blodprøver til bakteriedyrkning ble tatt daglig fra lårvenen og sykkeligheten til dyrene overvåket. Kun
 10 AbM ekstrakt A ga signifikant lavere CFU nivå sammenliknet med PBS kontrollen ($p < 0.05$) (Fig. 1). Overlevelsesraten til mus gitt AbM-ekstrakt A var også høyere enn til mus gitt PBS ($p < 0.05$) (Fig. 2). Selv om ingen kontrolldyr overlevde dag 5 etter smitte, var 38% av dyrene i gruppe A i live etter 6 dager. Blant disse levde fortsatt 25% på dag 7, men måtte avlives pga. nevrologiske komplikasjoner. AbM ekstrakt D viste en
 15 tendens til lavere bakterietall i blod og øket overlevelse, men forskjellene var ikke statistisk signifikante i forhold til PBS (Fig. 1, 2).

Effekt av AbM-ekstrakt gitt 24 timer før eller med smitte, på S. pneumoniae 6B-infeksjon

I neste eksperiment ble AbM-ekstrakt A eller PBS gitt enten 24 timer, 2 timer eller
 20 umiddelbart før smitte. Selv om funnet ovenfor med AbM-ekstrakt A gitt 2 timer før smitte, ikke var statistisk signifikant, viste eksperiment 2 den samme tendens (Fig. 3, 4). Den forebyggende positive effekten til AbM-ekstrakt A ble statistisk konfirmert når ekstraktet ble gitt 24 timer før smitte, både mht. bakterietall i blod ($p < 0.05$) (Fig. 3) og overlevelsesrate ($p < 0.05$) (Fig. 4). Det var også liknende og signifikante resultater når
 25 ekstrakt A ble gitt like før smitte. Faktisk overlevde 38% av dyrene som fikk AbM-ekstrakt A to eller 0 timer før smitte dag 10 i dette forsøket sammenliknet med 10-20% av kontrollene etter dag 7. Best resultat ble oppnådd når ekstrakt A ble gitt 24 timer før smitte da dette ga en overlevelsesrate etter 10 dager på hele 50% (Fig. 4) i forhold til PBS kontroll etter 7 dager på 13%.

Diskusjon

I motsetning til tidligere eksperimenter med β -glukaner og et sukkerekstrakt fra den sårhelende planten *Plantago major* L. (groblad) gitt i.p. i den beskrevne infeksjonsmodellen i mus, var AbM ekstrakt A vel så effektivt selv når det ble gitt via mavesonde. β -glukanet med den høyeste effekten etter i.p. administrasjon, hadde ikke effekt når det ble gitt via mavesonde til musene i denne pneumokokk-infeksjonsmodellen. Dette gjør trolig AbM ekstrakt mer nyttig enn β -glukan fordi det ikke krever sterilisering av produktet for intravenøs injeksjon og dermed strenge GMP (good manufacturing practise) krav, samt at produktet kan inntas utenfor sykehus. Vi har tidligere vist at β -glukanene SSG og MacroGard® også forsterker allergiutvikling i en musemodell (Ormstad et al., 2000, Hetland et al., 2000). AbM-ekstrakt A gitt via mavesonde i samme modell viser ingen slik bieffekt.

Kurvene for bakterie-innhold i blod steg brattere i forsøk 1 enn 2 pga. injeksjon av det doble antall *S. pneumoniae* CFU i det første (1.92×10^6 CFU) i forhold til det andre (0.97×10^6 CFU) eksperimentet. Hensikten var å utfordre dyrene med $100 \times LD_{50}$ (dødelig dose for 50% av individene) ($= 100 \times 1.2 \times 10^4$ CFU (Aaberge et al. 1995)) for *S. pneumoniae* serotype 6B. Men fordi antallet CFU som gis er beregnet ut fra antall bakterie CFU som ble nedfrosset etter forrige dyrkning, vil det eksakte antall levende bakterier, dvs CFU, som injiseres ikke være kjent før dyrkningssvaret av en parallell bakterieprøve foreligger. Det lavere antall bakterier som ble injisert i eksperiment 2 ga også en høyere overlevelseshastighet (10-20% etter 7 dager) av kontrolldyrene i forhold til eksperiment 1 (0% etter 3 dager). Dette er trolig årsaken til manglende statistisk signifikant forskjell mellom AbM-ekstrakt A og PBS gitt 2 timer før smitte.

Effekten av AbM-ekstrakt A gitt samtidig med smitte, peker også mot en trolig positiv behandlingseffekt av ekstraktet. Det ble ikke gitt i etterkant pga. tidlig høy dødelighet av forsøksdyrene i kontrollgruppen i denne infeksjonsmodellen. Dette vil bli forsøkt i en annen infeksjonsmodell med lavere dødelighet. Siden immunsystemet bruker liknende mekanismer til å bekjempe kreftceller og virusinfiserte celler, nemlig naturlige dreper (NK) celler og cytotoksiske T-lymfocytter, og AbM har effekt ovenfor kreft, vil AbM trolig også ha positiv effekt ovenfor virusinfeksjoner.

AbM vil trolig kunne brukes som supplement til vaksiner hos utsatte grupper, for eksempel personer som har fått fjernet milten og som man vet derfor er mer utsatt for å få pneumokokk-lungebetennelse og –blodforgiftning. Andre aktuelle målgrupper kan være turister som skal reise til land med dårlig hygiene eller kirurgiske pasienter hvor

- det gis forebyggende antibiotikaprofylakse før operasjon. Man kan også tenke seg at mer utstrakt bruk av en "immunstimulerende" substans som AbM vil kunne dempe antibiotikabruk og "overvaksining" og gi immunsystemet større mulighet til å "utdanne seg" til bekjempelse av mikrober, og slik også ha en dempende effekt på allergiutvikling. I følge hygienehypotesen skyldes den økende allergifrekvensen i vestlige land atbefolkningen skjermes mer for sykdomsfremkallende mikrober. Det faktum at AbM er vist å beskytte mot kreft i en musemodell og det ikke er kjente bivirkninger av AbM ekstrakt hos millioner japanske helsekostbrukere, øker også nytteverdien av AbM som forebyggende/behandlende middel.

10 Konklusjon

- Foreliggende resultater viser at et AbM-ekstrakt beskytter mot dødelig pneumokokk-infeksjon i mus når ekstraktet gis via mavesonde. Kun høyrensete ekstrakter ("gold label") har signifikant effekt. Positiv effekt ble funnet når ekstraktet ble gitt fra 24 timer før til umiddelbart før bakteriesmitte. Dette ble demonstrert vha. lavere bakterietall i blod og øket overlevelsesrate hos dyr som fikk AbM ekstrakt sammenliknet med dyr som fikk saltvann. Det faktum at ekstraktet virker etter inntak via fordøyelsessystemet, gjør AbM svært interessant som et antibakterielt medisinsk middel. AbM-ekstrakt vil kunne forebygge mot og trolig også virke terapeutisk ovenfor infeksjon spesielt med bakterier, men sannsynligvis også andre sykdomsfremkallende mikroorganismer. I en tid med økende antibiotikaresistens vil AbM kunne være et naturlig supplement eller alternativ, med færre bivirkninger, til antibiotika og evt. andre anti-infeksjonsmidler, samt ha positiv bieffekt som kreftbeskyttende substans.

Tabellene og figurene anført nedenfor relaterer seg til de forsøk som er beskrevet tidligere.

25 Tabell 1

Forsøksprotokoll for AbM behandling via mavesonde av NIH/OlaHsd mus infisert med pneumokokker (*Streptococcus pneumoniae*) av serotype 6B.

A) Eksperiment 1: Behandling med forskjellige AbM ekstrakter 2 timer før smitte

Gruppe	Dag 0,-2t	Dag 0, 0t	Dag 10
AbM A	Ekstrakt A	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning

Gruppe	Dag 0,-2t	Dag 0, 0t	Dag 10
AbM B	Ekstrakt B	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning
AbM C	Ekstrakt C	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning
AbM D	Ekstrakt D	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning
AbM E	Ekstrakt E	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning
PBS	PBS	Pn6B 1.9×10^6 CFU	Avslutning

B) Eksperiment 2: Behandling med AbM A ekstrakt på forskjellige tidspunkt før smitte

Gruppe	Dag -1	Day 0, -2t	Dag 0, 0t	Dag 0, 0t	Dag 10
AbM -24t	Ekstrakt A			Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
PBS -24t	PBS			Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM -2t		Ekstrakt A		Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
PBS -2t		PBS		Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
AbM 0t			Ekstrakt A	Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning
PBS 0t			PBS	Pn6B $\times 10^6$ CFU	Avslutning

Forkortelser: AbM (*Agaricus blazei* Murill), Pn (pneumokokker)

Figurelegende

Fig. 1.

- Antall pneumokokker av serotype 6B CFU i perifert blod fra NIH/Ola Hsd hunnmus forbehandlet med AbM ekstrakt A-E eller PBS via mavesonde (volum 200 μ l) 2 timer før injeksjon i bukhulen (i.p.) med 1.92×10^6 CFU av pneumokokker type 6B (se Tabell 1). Dyrene ble blødd ved angitte intervaller, prøvene sådd ut og antall CFU tallet. Døde dyr er angitt som dyr med 1×10^9 CFU i blodet. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser lavere CFU nivåer i AbM ekstrakt A-behandlede dyr.

Fig. 2.

- Overlevelsesrate (median verdier) for musene i Fig. 1. som ble forbehandlet med AbM ekstrakter eller PBS 2 timer før i.p.smitte med pneumokokker serotype 6B. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser høyere overlevelse av AbM ekstrakt A-behandlede dyr.

Fig. 3.

- Antall pneumokokker av serotype 6B CFU i perifert blod fra NIH/Ola Hsd hunnmus forbehandlet med AbM ekstrakt A eller PBS via mavesonde (volum 200 μ l) 24 eller 2 timer eller umiddelbart før (i.p.) injeksjon med 0.97×10^6 CFU av pneumokokker type 6B (se Tabell 1). Dyrene ble blødd ved angitte intervaller, prøvene sådd ut og antall CFU tallet. Døde dyr er angitt som dyr med 1×10^9 CFU i blodet. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser lavere CFU nivåer i AbM ekstrakt A-behandlede dyr. Merk: logaritmisk skala på Y-aksen.

Fig. 4.

- Overlevelsesrate (median verdier) for musene i Fig. 3. som ble forbehandlet med AbM ekstrakt A eller PBS 24-0 timer før i.p. smitte med pneumokokker serotype 6B. Datapunktene representerer median verdier fra 8 dyr og viser høyere overlevelse spesielt av dyr behandlet med AbM ekstrakt A 24 t før smitte.

Det er ifølge foreliggende oppfinnelse foretrukket å gi AbM-ekstraktet med den antibakterielle virkning i kombinasjon med minst et ytterligere medikamentelt middel,

hvor det videre er foretrukket at det ytterligere medikamentelle middel er et antibakterielt middel.

- Det er også videre foretrukket å gi det moreliggende AbM-ekstrakt som et oralt middel. I denne sammenheng kan ekstrakter bli gitt som sådan, men det kan også kombineres
- 5 med vanlige bæremidler og eksipienter slik at det kan bli gitt som et flytende middel så som en eliksir, en mikstur, en tinktur etc. Alternativt kan AbM-ekstraktet bli gitt i form av et fast medikament så som en pille, en tablett, en kapsel, en sugetablett etc.. I denne sammenheng kan medikamentet også bli tilsatt vanlige tilsatsstoffer så som smaksstoffer (sukker, søtningsstoffer etc.) og fargestoffer.

Referenser

- Wasser S and Weiss A (1999). Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: Current perspectives (review). *Int J Med Mushrooms*, 1, 31-62.
- 5 Ikekawa T (2001). Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms on health care. *Int J Med Mushrooms*, 3, 291-298.
- Chen A (2000). A practical guide to the cultivation of *Agaricus blazei*. The mushroom grower's newsletter IV: 3.
- 10 Huang N-L (1997). Brazilian mushroom (Gee Song Rong). Cultivation of eighth rare and precious gourmet mushrooms. Chinese Agr Press, Huang Ed: 95-101.
- Kawagishi H, Inagaki R, Kanao T, Mizuno T, Shimura K, Ito H, Hagiwara T, Nakamura T (1989). Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. *Carbohydr Res* 15, 267-273.
- 15 Iwade I & Muzuno T (1997). Cultivation of Kawariharatake. *Food rev Int* 13, 383.
- 20 Stamets P (2000). The Himematsutake mushroom of the genus *Agaricus*, *Agaricus blazei* murill. *Growing Gourmet and Med Mushrooms*, 3rd Ed.
- Ohno N, Furukawa M, Miura NN, Adachi Y, Motoi M, Yadomae T (2001). Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*. *Biol Pharm Bull* 24: 820-8, 2001.
- 25 Sorimachi K, Akimoto K, Ikehara Y, Inafuku K, Okubo A, Yamazaki S. (2001) Secretion of TNF-alpha, IL-8 and nitric oxide by macrophages activated with *Agaricus blazei* Murill fractions in vitro. *Cell Struct Funct.* 26(2):103-8.
- 30 Itoh H, Ito H, Amano H, Noda H. (1994) Inhibitory action of a (1-->6)-beta-D-glucan-protein complex (F III-2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murill ("himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Jpn J Pharmacol.* 66(2):265-71.
- 35 Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kobori H, Moriguchi K, Nakashima H, Matumoto Y, Takahara S, Ebina T, Katakura R. (1998) Selective tumoricidal effect of soluble proteoglucan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother.* 46(3):147-59.
- 40 Ebina T, Fujimiya Y. (1998) Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* in a double-grafted tumor system in mice. *Biotherapy.* 11(4):259-65.

- Takaku T, Kimura Y, Okuda H (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *J Nutr* 131, 1409-1413.
- 5 Menoli RC, Mantovani MS, Ribeiro LR, Speit G, Jordao BQ (2001). Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murill extracts on V79 cells. *Mutat res* 20, 5-13.
- Bellini MF, Giacomini NL, Eira AF, Ribeiro LR, Mantovani MS (2003). Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO-k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicol in vitro* 17, 465-469.
- 10 Sorimachi K, Ikehara Y, Maezato G, Okubo A, Yamazaki S, Akimoto K, Niwa A (2001) Inhibition by *Agaricus blazei* Murill fractions of cytopathic effect induced by western equine encephalitis (WEE) virus on VERO cells in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 1645-7.
- 15 Henrichsen J. (1979) The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. *J. Infection* 1(suppl. 2), 31-37.
- 20 Aaberge, I.S., Eng, J., Lermark, G. and Løvik, M. (1995) Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microb. Pathogen.* 18, 141-152.
- 25 Riggi, S. and Di Luzio, N.R. (1961) Identification of a RE stimulating agent in zymosan. *Am. J. Physiol.* 200, 297-300.
- Bøgwald, J., Gouda, I., Hoffmann, J., Larm, O., Larsson, R. and Seljelid, R. (1984) Stimulatory effect of immobilized glucans on macrophages in vitro. *Scand. J. Immunol.* 20, 355-360.
- 30 Reynolds, J.A., Kastello, M.D., Harrington, D.G., Crabbs, C.L., Peters, C.J., Jemski, J.V., Scott, G.H. and Di Luzio, N.R. (1980) Glucan-induced enhancement of host resistance to selected infectious diseases. *Infect. Immun.* 30, 51-57.
- 35 Franek J, Malina J, Kratka H. (1992) Bacterial infection modulated by glucan: a search for the host defense potentiation mechanisms. *Folia Microbiol (Praha)*. 37(2):146-52.
- 40 Taguchi, T., Furue, H., Kimura, T., Kondo, T., Hattori, T. and Ogawa, N. (1983) Clinical efficacy of lentinan on neoplastic diseases. *Adv. Exp. Med. Biol. Biotherapy* 166, 181-187.
- 45 Ohno, N., Kurachi, K. and Yadomae, T. (1987) Antitumor activity of highly branched (1→3) beta-D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotiorum* IFO 9395. *J. Pharmacobiodyn.* 10, 478-486.

- Hetland, G., Løvik, M. and Wiker, H.G. (1998) Protective effect of β -glucan against mycobacterium bovis, BCG infection in Balb/c mice. Scand. J. Immunol. 47, 548-553.
- 5 Hetland G, Ohno N, Aaberge Is, Løvik M. (2000a) Protective effect of β -glucan against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. FEMS Immunol Med Microbiol 27:111-116.
- 10 Hetland G, Samuelson AB, Løvik M, Paulsen BS, Aaberge IS, Goeng E-C, Michaelsen TE. (2000b) Protective effect of *Plantago major* L. pectin polysaccharide against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. Scand J Immunol 52: 348-355.
- 15 Hetland G (2003). Anti-infective action of immuno-modulating polysaccharides (β -glucan and *Plantago major* L. pectin) against intracellular (*Mycobacteria sp.*) and extracellular (*Streptococcus pneumoniae sp.*) respiratory pathogens (Review) Curr Med Chem – Anti-Infec Agens 2, 135-147.
- 20 Hetland G, Sandven P. (2002) β -1,3-glucan reduces growth of Mycobacterium tuberculosis in macrophage cultures. FEMS Immunol Med Microbiol, 33: 41-45.
- 25 Ormstad H, Groeng E-C, Løvik M, Hetland G. (2000) The fungal cell wall component β -1,3-glucan has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. J Toxicol Environ Health, Part A, 61, 55-67.
- 30 Hetland G, Ormstad H, Ohno N, Løvik M. Fungal β -1,3-glucan SSG from the fungus *Sclerotinia sclerotiorum* adjuvates the allergic response to ovalbumin in mice. In: Healthy Buildings 2000: Exposure, Human Responses and Building Investigations. Eds.: Seppänen O, Säteri J. Publisher: Gummerus Kirjapaino SIY Indoor Air Information Oy, Finland Vol. 1, pp. 245-250.
- 35



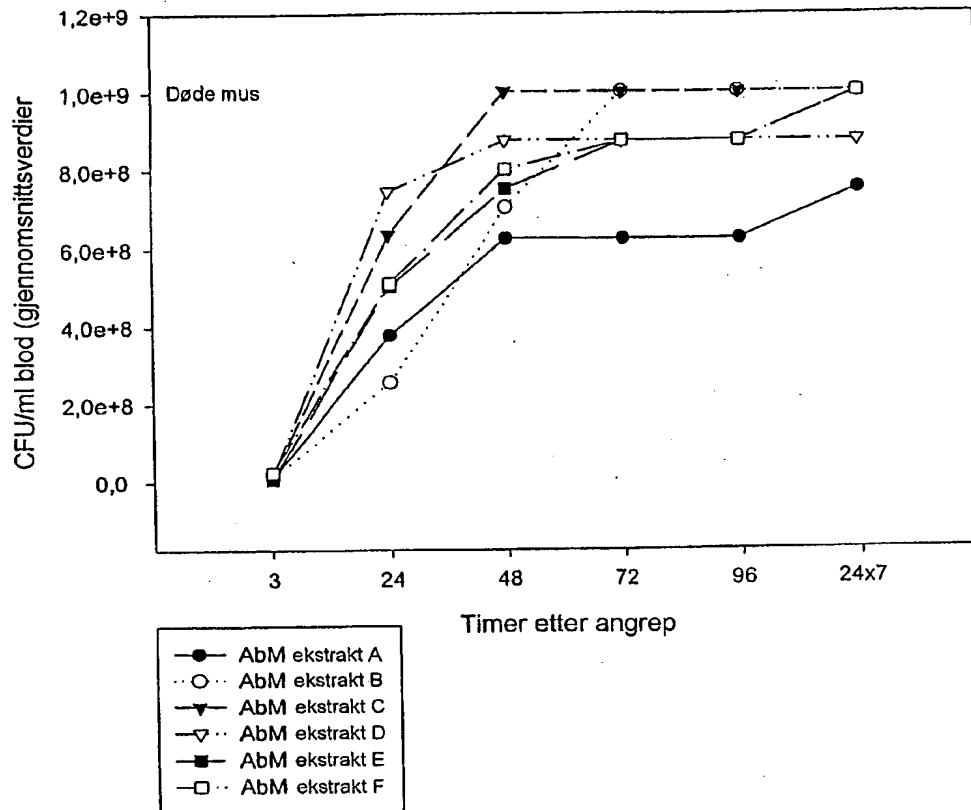
Patentkrav

1. Anvendelse av *Agaricus blazei* Murill (AbM) ved fremstilling av et medikament til bekjempelse eller forebygning av bakterielle infeksjoner i pattedyr.
2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor den bakterielle infeksjonen er forårsaket av pneumokokker.
5
3. Anvendelse ifølge krav 2, hvor pneumokokken er *Pneumococcus pneumoniae*.
4. Anvendelse ifølge krav 1 – 3, hvor medikamentet er et oralt medikament.
5. Anvendelse ifølge krav 1 – 3, hvor medikamentet er et intravenøst preparat.
6. Anvendelse ifølge krav 1 – 5, hvor medikamentet omfatter minst et ytterligere medikamentelt middel.
10
7. Anvendelse ifølge krav 6, hvor det ytterligere medikamentelle middel er et antibakterielt middel.
8. Anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, hvor pattedyret er et menneske.



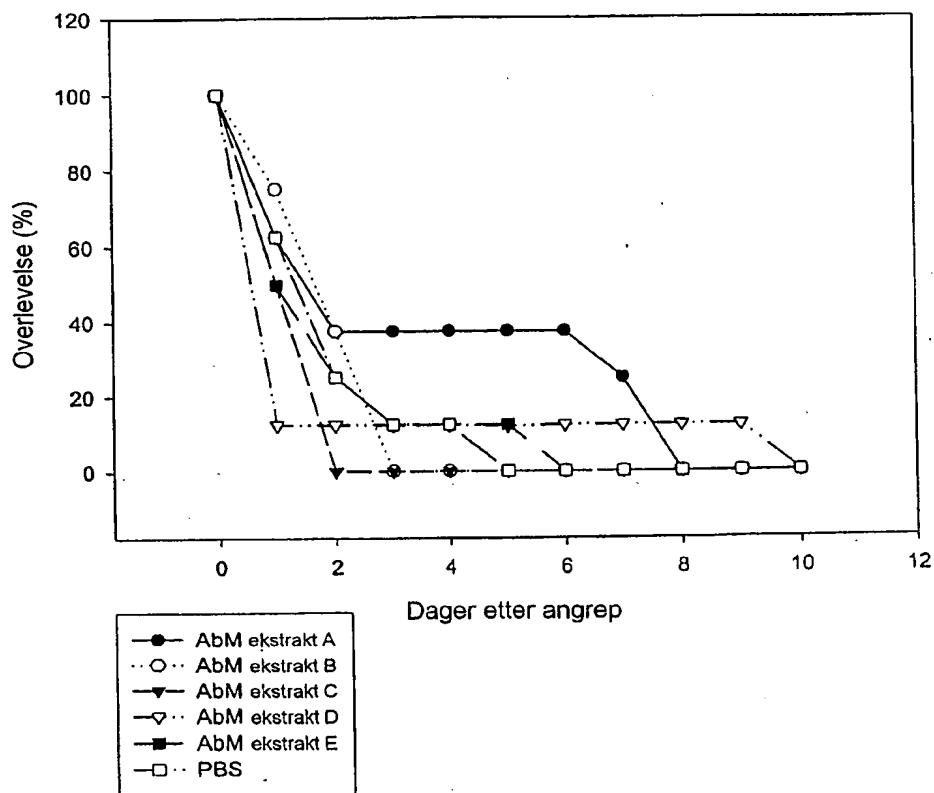
Figur 1.

Bakteriemi i NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 2 timer etter forskjellige AbM-ekstrakter p.o.



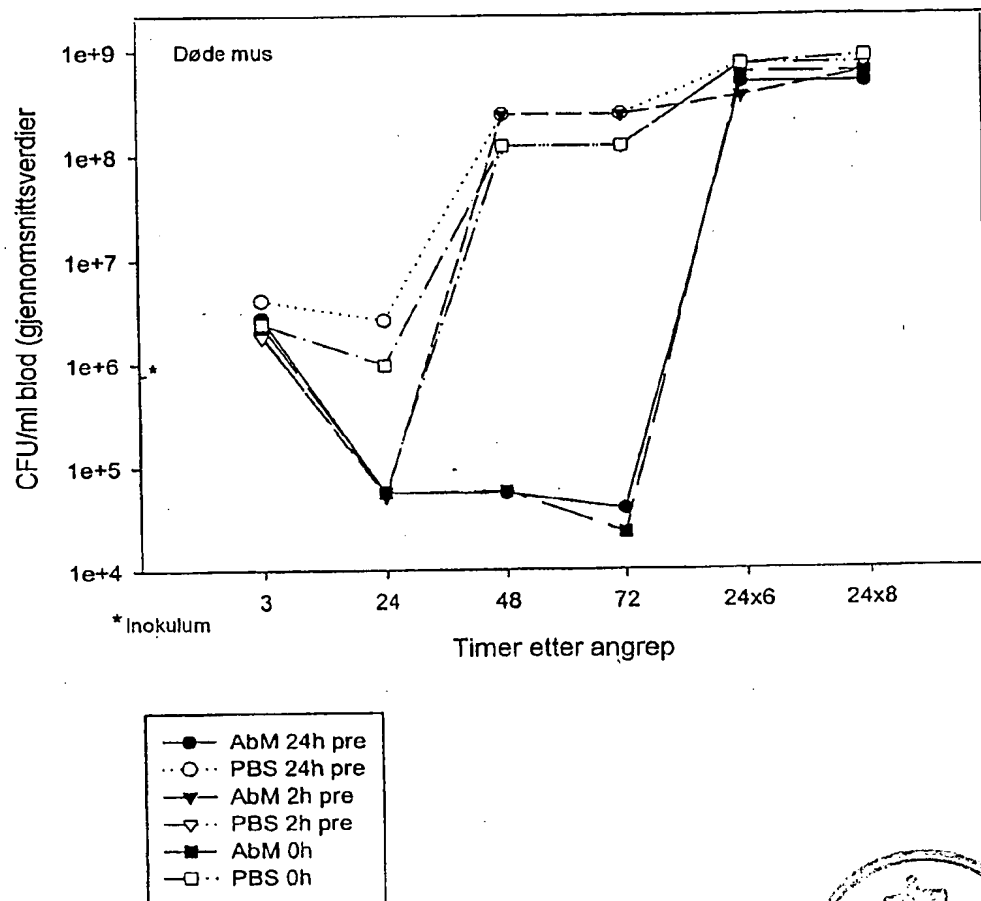
Figur 2.

Overlevelse av NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 2 timer etter forskjellige AbM-ekstrakter p.o.



Figur 3.

Bakteriemi i NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 24 timer eller 2 timer eller sammen med AbM-ekstrakt A p.o.



Figur 4.

Overlevelse av NIH/Ola-mus gitt *S. pneumoniae* 6B i.p. 24 timer eller 2 timer etter, eller sammen med AbM-ekstakt A p.o.

